Original Article — Full Translation

極めて低レベルの第 VIII 因子活性（FVIII:C）を定量するための改変合成基質法

A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of factor VIII activity (FVIII:C)

R. Yatuv, I. Dayan and M. Baru

Omri Laboratories Ltd, Weizmann Science Park, Nes-Ziona, Rehovot, Israel

要　約：極めて低レベルの血漿中第 VIII 因子（FVIII）活性を測定するための精密で高感度な合成基質法が本研究により開発された。この定量法は，市販されている合成基質法キットに改変を加えたものである。改変とは，すなわち，検体最終希釈率の低減と反応時間の延長である。この改変法を使用することにより 0.001 ～ 0.02 IU/mL を正確に定量することが可能である。検出限界と定量限界は，それぞれ 0.0005 IU/mL と 0.0015 IU/mL である。この改変法は，研究の場において，そして血友病 A 症例に対する治療効果を評価する臨床現場の双方において有用である。

Key words：合成基質法，第 VIII 因子，血友病 A

序　　論

第 VIII 因子（FVIII）活性レベル（FVIII:C）の正確な測定は，血友病 A 症例における疾患の重症度の評価や，臨床症状との相関を評価するうえで非常に重要である。FVIII:C の測定法としては，凝固法[1]，合成基質法[2]，トロンビン生成検査[3, 4]および活性化部分トロンボプラスチン時間測定[5]などが挙げられる。しかし，FVIII:C が 0.01 IU/mL 未満であった場合には，これらの測定法の定量限界（QL）および精度には限界がある[6]。このようなことから，研究の場および臨床の場において，極めて低レベルの FVIII:C をシンプルにそして正確に測定できる定量法の開発が待たれている。

Correspondence: Moshe Baru, DSc, Omri Laboratories, Bldg 22, Weizmann Science Park, Nes-Ziona, PO Box 619, Rehovot 76106, Israel.
Tel.: +972 8 9302970; fax: +972 8 9302975;
e-mail: moshe@omrilabs.co.il

Haemophilia（2006），12，253－257
©Blackwell Publishing Ltd.

合成基質法は，FVIII:C の測定に 20 年以上前に導入された定量法である[2]。この定量法は，試薬と活性化 FIX（FIXa）の混合物に希釈した FVIII 試料を加えると，FXa が生成されることに基づいている。生成された FXa は，蛍光合成基質を加水分解し，蛍光色素を遊離させる。発色の強度は FVIII:C に比例する。タイプの異なるいくつかの測定キットが市販されているが，これらのキットの検出限界（DL）は 0.005 IU/mL であるとともに，このレベルにおけるこれらのキットの信頼性と精度は決して高いとはいえない[6]。Coamatic 合成基質法キット［Chromogenix 社（イタリア）］は，Ca^{++} イオンとリン脂質，トロンビンの存在下で FIXa により FX を活性化させ FXa を生成させることによって，FVIII コファクターの活性を測定するものである。FXa は蛍光合成基質 S-2765 を加水分解し，蛍光色素 *p*－ニトロアニリン（pNA）を遊離させて黄色の蛍光を発し，分光学的に 405 nm で評価可能である。発色の強度は，検体中 FVIII 量と線形に比例する。このキットを使用した場合の FVIII 検出限界は 0.005 IU/mL である。

我々は今回の研究で，Coamatic を使用した定量法に改変を加え，測定感度を著明に向上させることに成功した。改変は，次の 2 点である ── ① 検体最終希釈率の低減（1:80→ 1:30），② 反応時間の延長（10 分→ 30 分）（反応時間とは，すなわち，基質とのインキュベーション時間である）。これらの改変を加えることによって，DL 0.0005 IU/mL，QL 0.0015 IU/mL での定量が可能になった。この改変法はシンプルであるとともに，低レベルの FVIII:C の定量において，現在知られている他の定量法よりも高感度であり，研究目的で，そして臨床現場において血友病 A 症例に対する治療効果を評価するうえでも有用である。

材料および方法

標準サンプルと FVIII 欠乏血漿

National Institute for Biological Standards and Control［NIBSC（英国）］から FVIII 国際標準サンプルを入手した。この標準サンプルは，第 7 次国際標準サンプルで，凍結乾燥された血漿由来 FVIII を含有し，ヒトアルブミンが添加されている。また，この標準サンプルは 2003 年 11 月に世界保健機関（WHO）の Expert Committee on Biological Standardization により承認されている。

さらに，プールされた重症血友病症例（severe haemophilia patients；SHP）のクエン酸血漿を HRF Inc.（米国）より入手した。

Coamatic 原法

製造元の取扱説明書に従って，FVIII kit（Chromogenix, Milan, Italy）試薬を溶解し，加温した。ワーキング溶液は次の通りである ── ① 緩衝液 25 mM トリス（pH 7.9），0.9% NaCl，1%ウシ血清アルブミン（BSA），② $CaCl_2$（6.7 mM）とリン脂質（0.03 mM）とともに凍結乾燥したウシ FIXa（0.05 U/mL），FX（0.45 IU/mL）およびトロンビン（0.17 NIH-U）を含有する凝固因子試薬，ならびに ③ S-2765（Xa 基質）0.43 mg/mL および I-2581（トロンビンインヒビター）0.011 mg/mL。

取扱説明書に従って FVIII 標準サンプルを蒸留水に溶解し，SHP 血漿で 0.1 IU/mL に希釈した。この希釈液を Coamatic キット緩衝液でさらに二段階希釈した。まず，0（緩衝液のみのブランク値），0.001，0.0025，0.005，0.0075，0.01，0.015 および 0.02 IU/mL に希釈した検体を作製し，第二段階として各検体 12.5 μL を緩衝液 1 mL に加えた（さらなる 1:80 の希釈）。すべての試薬を，マッチングディスペンサーチップ付きエッペンドルフピペットでマイクロプレートに滴下した。

各希釈率の検体を 3 個（各 50 μL）作製してウェルに注入し，37°C で 4 分間加温した。予め加温した凝固因子試薬（50 μL）を各ウェルへ添加し，プレートを静かに攪拌し，37°C でさらに 4 分間インキュベートした。さらに，予め加温した S-2765（50 μL）を各ウェルへ添加し，穏やかに混合するとともに 37°C でさらに 10 分間インキュベートした。20%酢酸（50 μL）を各ウェルへ添加してこの反応を停止させ，マイクロプレートを穏やかに振とうした後に，可変波長マイクロプレートリーダー VERSAmax［Molecular Devices 社（米国）］を使用して，各ウェルの pNA 蛍光発色を 405 nm で測定した。この定量法における「反応時間」は，S-2765 の添加から酢酸添加までの時間である。

Coamatic 改変法

この定量法は，原法とほぼ同様に実施されるが，2 つの測定パラメーターに改変を加えた。最初の改変として，前希釈された検体 50，33，20 μL を緩衝液 1 mL に加えた最終希釈率の異なる 3 つのタイプの最終希釈液（それぞれ 1:20，1:30 および 1:50）を作製し，推奨されている最終希釈率である 1:80 で希釈した検体での結果と比較した。2 つ目の改変として，反応時間を 20，30，40，50，60 分に延長して，推奨されている反応時間の 10 分での結果と比較した。原法および改変法での吸光度（OD）測定値を FVIII:C に対して算術的にプロットした。

統計学的解析

マイクロソフト Excel 2002［マイクロソフト社（米国）］，GraphPad Prism Program Version 4.02［GraphPad Software 社（米国）］を使用した。各定

量法の DL および QL は，International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use（ICH）のガイドライン［Validation of Analytical Procedures（ICH Q2A）］[7] に従って算出した。簡潔にいえば，標準曲線を作成し，回帰直線の傾きを求めた。ブランクの 10 検体（緩衝液のみ，または SHP 血漿のみ）を評価し，10 回の反応の標準偏差を算出した。また，DL と QL は次の式で算出した。

DL = 3.3 ×ブランク検体での標準偏差 / 回帰直線の傾き

QL = 10 ×ブランク検体での標準偏差 / 回帰直線の傾き

結　果

最終希釈率が測定感度に与える影響

極めて低レベルの FVIII:C を測定するための方法を開発するためには，正確な標準曲線を作製しなければならない。そこで我々は，較正された FVIII 製剤［NIBSC により提供されている第 7 次標準サンプル（99/678）］を使用して信頼できる較正曲線を作成し，改変法で FVIII:C を測定した。最終希釈率を 1:20，1:30，1:50 および 1:80（製造元により推奨されている希釈率）とした以外は，取扱説明書に従って，4 セットの較正曲線（0.001 ～ 0.02 IU/mL）を Coamatic で検討した。反応時間の 30 分が経過した後に，405 nm の OD をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を Fig. 1 に示す。

OD 値の分析では，最終希釈率が 1:30 の場合に線形が最も良好に適合することが示された［重決定係数（R^2）= 0.981］。希釈率の減少に伴って標準曲線の傾きが増加し，曲線上の相互の値の分別が容易になった。1:30 の希釈率で線形が最も良好に適合し（$R^2 > 0.98$），傾きも大きかったことから，その後の分析にはこの希釈率を使用した。

反応時間が測定感度に与える影響

反応時間の延長が最終希釈率 1:30 の標準曲線に与える影響を検討した。検体を基質とともに 10，20，30，40，50，60 分間にわたりインキュベートし，405 nm における OD をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を Fig. 2 に示す。適合直線の傾きは反応時間の延長に伴って増加したが，40 ～ 60 分では R^2 が 0.98 未満へ減少した。よって，線形の適

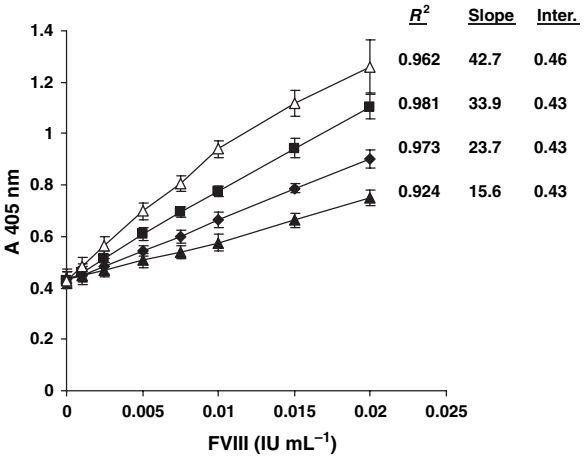

Fig. 1. Effect of sample dilution. A standard dilution set (0.001–0.02 IU mL^{-1}) of seventh international standard 99/678 factor VIII concentrate was analysed using a Coamatic chromogenic assay with final dilutions of 1:20 (△), 1:30 (■), 1:50 (◆) or 1:80 (▲) and 30-min incubation with S-2765 substrate. Data are mean ± SD of three independent experiments. R^2, slope and intercept values of each curve are indicated.

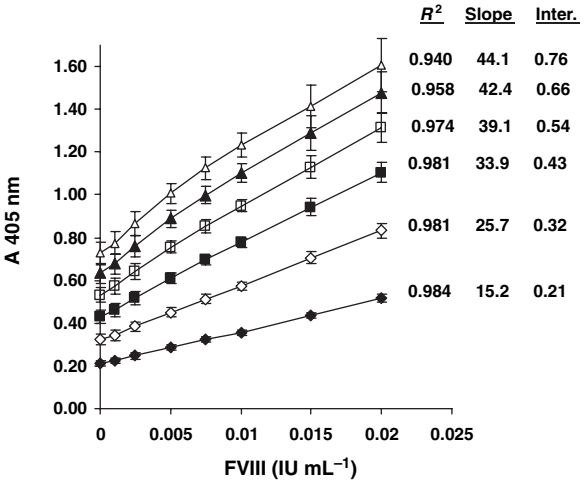

Fig. 2. Effect of development time. A standard dilution set (0.001–0.02 IU mL^{-1}) of seventh international standard 99/678 factor VIII concentrate was analysed using a Coamatic chromogenic assay with incubations of 10 (◆), 20 (◈) 30 (■), 40 (□), 50 (▲) or 60 (△) min with S-2765 substrate. Data are mean ± SD of three independent experiments. R^2, slope and intercept values of each curve are indicated.

合性が良好（R^2 = 0.981）で傾き値が有意（33.9）であった 30 分が，この定量法に推奨される反応時間と決定した。また，特に注目すべき点は，反応を停止させるために 20％酢酸を添加しても，較正曲線およびそのいずれのパラメーターにも有意な変化がみられなかったことである（データ非掲載）。

原法と改変法との比較

最良の改変方法を決定した後，改変法（最終希釈率 1:30，反応時間 30 分）と原法（最終希釈率 1:80，反応時間 10 分）とを直接的に比較した。緩衝液で 1:80 および 1:30 に希釈した較正済み FVIII 製剤［NIBSC により提供されている第 7 次標準サンプル（99/678）］を使用して標準曲線を作成し，FVIII:C を測定した。Fig. 3 に結果を示す。反応時間の延長に伴ってブランク検体 OD 値の増加が認められたため，比較を容易にするために両曲線からブランク値を差し引いた。「材料および方法」に記載した要領で DL および QL を算出し，結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3 に示されるように，改変法での直線の傾きは原法での直線の傾きの 5 倍で，結果として，原法での DL と QL（それぞれ 0.0005，0.0015）は，改変法での値（それぞれ 0.0025，0.0076）の 1/5 であった。さらに，改変法の R^2（0.981）は原法での値（0.939）よりも大きかった。

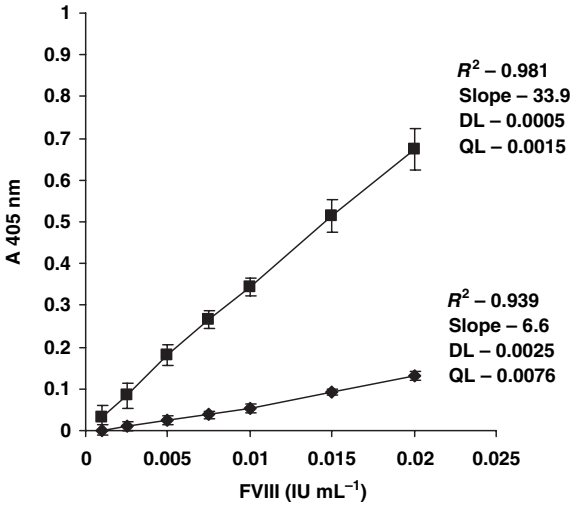

Fig. 3. Direct comparison of original and modified protocol. A standard dilution set (0.001–0.02 IU mL^{-1}), of seventh international standard 99/678 factor VIII concentrate in a buffer was analysed using a Coamatic chromogenic assay with the original (◆) or the modified (■) protocols. Data are mean ± SD of three independent experiments. Blank values (buffer only) were subtracted from both curves. R^2, slope, DL and QL values of each curve are indicated.

SHP 血漿中 FVIII:C の測定

SHP 血漿に低レベルの FVIII を加え，FVIII:C が極めて低い血友病患者の血漿を模倣し，SHP 血漿中 FVIII:C の測定における改変法の検出感度を評価した。取扱説明書に従って，FVIII 国際標準サンプル 99/678 を蒸留水に溶解し，SHP 血漿で 0.1 IU/mL へ希釈した。希釈した標準サンプルを SHP 血漿または緩衝液に加え，0.001 ～ 0.02 IU/mL の標準曲線を作成した。すべての検体を最終希釈率である 1:30 まで希釈し，改変法に従って分析した。個別に 3 回行った実験の結果を Fig. 4a および Fig. 4b に示す（Fig. 4a はブランク値を含む値を示し，Fig. 4b は緩衝液および SHP 血漿のブランク値を差し引いた値を示す）。この結果は，緩衝液中 FVIII と標準サンプル中 FVIII について，傾きが極めて近似した 2 つの平行な曲線が得られたことを示している（緩衝液中 FVIII での傾き = 34，SHP 血漿中 FVIII での傾き = 32.8）（Fig. 4a）。2 つの曲線の切片が異なっているが，これは緩衝液と SHP 血漿の元々の OD が異なるためである。緩衝液および SHP 血漿のブランク値を差し引いた場合，両曲線は極めて近似しており（Fig. 4b），この定量法が血漿成分の存在によって影響されないこと，そして SHP の極めて低い FVIII:C のモニタリングに有用であることを示している。

考　察

補充療法を受けている血友病患者をより良好にモニタリングするため，そして長時間作用型 FVIII 製剤を開発するため[8]，さらに，遺伝子治療臨床試験における循環血液中 FVIII:C の評価を可能とするために，極めて低レベルの FVIII:C を正確に測定することの必要性がここ数年高まっている。FVIII:C が 0.01 IU/mL 未満の SHP では，DL 未満の FVIII:C の相違により出血症候が大きく異なってくる可能性

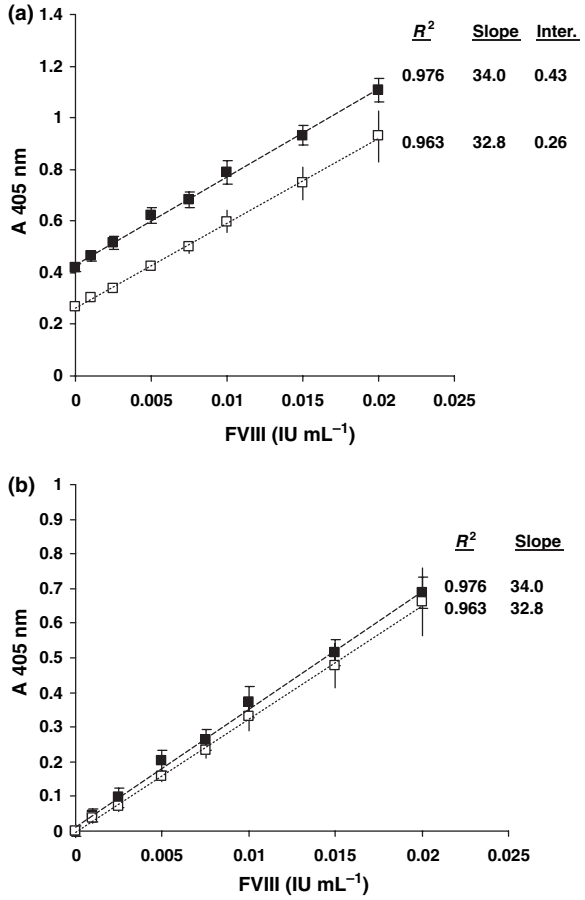

Fig. 4. Standard dose–response in plasma and buffer. A standard dilution set (0.001–0.02 IU mL^{-1}), of seventh international standard 99/678 factor VIII concentrate in a buffer (■) and pool of plasma of haemophilic patients (□) were analysed using the modified protocol. Data of OD values (a) and after subtraction of blank values of buffer and plasma (b) are mean ± SD of three independent experiments. R^2, slope and intercept values of each curve are indicated.

がある[9]。重症血友病患者の定期補充療法に関する最近の研究では，0.01 IU/mL 未満の FVIII:C（または FIX:C）でさえ，自然出血の予防に十分であることが示唆されている[10]。また，FVIII および FIX の遺伝子治療を検討した最近の臨床研究では，極めて低い凝固因子活性の臨床的有効性が示されている。まず，ウイルスを使用せずに FVIII 遺伝子導入を行った研究では，得られた凝固因子活性レベルが比較的低かったにもかかわらず，臨床的改善（自然発生出血発症頻度および FVIII 製剤使用頻度の減少）が認められている[11]。アデノ随伴ウイルスを使用して FIX 遺伝子を導入した他の研究では，合成基質法や凝固法による治療後の評価では著明な FIX:C の変化が認められなかったにもかかわらず，出血頻度の有意な低下が認められている[12]。

先端技術を使用して，低 FVIII:C 下の凝固能を決定する試みが既になされている。これらの試みには，トロンビン生成検査[3, 4]や rotational thromboelastography[8]，凝固波形解析[5]などが含まれる。しかし，検査結果と FVIII:C との相関が必ずしも確実とはいえないことに加え，これらの技術には，一般的とはいえない特別な設備や技能が必要とされる。一方，合成基質法は，FVIII:C の定量において信頼性が高く，ほとんどの凝固検査室で使用される一般的な手法である。しかし，現在市販されているキットでは 0.005 IU/mL 未満の FVIII:C を定量することができない。そこで我々は，このような低レベルの FVIII:C を検出・定量し得る方法を開発するため，既にその有用性が確立されている市販キットを使用して検出感度の改善を試みた。

次の 2 つの改変を評価した ── ① 検体最終希釈率の低減，② 反応時間の延長。この改変プロトコールを使用して，我々は 0.001 ～ 0.02 IU/mL という低レベルの較正曲線を分析した（Fig. 1 & 2）。この改変法によって傾きが比較的大きな標準曲線を得ることができた。また，改変法で得られた DL と QL（それぞれ 0.0005 と 0.0015 IU/mL）は，原法で得られた値（それぞれ 0.0025 と 0.0076 IU/mL）に比べて有意に低値（1/5）であった（Fig. 3）。したがって，この改変法は，原法の簡便性や自動化への適合性を損なうことなく，0.0015 IU/mL までの定量を可能とするものである。低レベルの FVIII を SHP 血漿に添加した検討においても同様の検出感度が得られ（Fig. 4），この定量法が血漿成分に影響されないこと，さらに，この定量法により SHP における極めて低レベルの血漿中 FVIII:C をモニタリングできることが示された。以上の結果から，この改変法は低レベルの FVIII:C の検出において信頼性が高く，簡便で，かつこれまでに使用されてきた他の定量法よりも感度が高いといえる。この定量法は，研究の場において，そして血友病 A 症例における低レベルの循環血液中 FVIII:C を評価する臨床の場において有用である。

References

1 Over J. Methodology of the one-stage assay of FVIII (FVIII:C). *Scand J Haematol* 1984; **33**: 11–24.

2 Rosen S, Andersson M, Blombäck M *et al*. Clinical applications of a chromogenic substrate method for determination of FVIII activity. *Thromb Haemost* 1985; **54**: 811–23.

3 McIntosh JH, Owens D, Lee CA, Raut S, Barrowcliffe TW. A modified thrombin generation test for the measurement of factor VIII concentrates. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1005–11.

4 Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR and Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Heamophilia* 2005; **11**: 321–34.

5 Shima M, Matsumoto T, Fukuda K *et al*. The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of FVIII activity (FVIII:C). *Thromb Haemost* 2002; **87**: 431–41.

6 Barrowcliffe TW. Monitoring haemophilia severity and treatment: new or old laboratory tests. *Haemophilia* 2004; **10**: 101–14.

7 ICH. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B*, 1996 (http://www.ich.org).

8 Baru M, Carmel-Goren L, Barenholz Y *et al*. Factor VIII efficient and specific non-covalent binding to PEGylated liposomes enables prolongation of its circulation time and haemostatic activity. *Thromb Haemost* 2005; **93**: 1061–8.

9 Ingerslev J, Poulsen LH and Sorensen B. Potential role of the dynamic properties of whole blood coagulation in assessment of dosage requirements in haemophilia. *Haemophilia* 2003; **9**: 341–52.

10 Petrini P. What factors should influence the dosage and interval of prophylactic treatment in patients with severe haemophilia A or B. *Haemophilia* 2001; **7**: 91–102.

11 Roth DA, Tawa NMD, O'Brien JM, Treco DA and Selden R. Nonviral transfer of the gene encoding factor VIII in patients with sever hemophilia A. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1731–42

12 Manno CS, Chew AJ, Larson PJ *et al*. AAV mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003; **101**: 2961–72.